



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

FACOLTA' DI SCIENZE MM. FF. NN.

Corso di Laurea in Biologia Molecolare

ELABORATO DI LAUREA

**INTERNALIZZAZIONE DI PROTEINE
MEDIANTE IL PEPTIDE TAT
IN CELLULE VEGETALI IN CULTURA**

*Tutor: Dott. Lorella Navazio
Dipartimento di Biologia*

*Co-Tutor: Dott. Manuela Miuzzo
CNR, Istituto di Neuroscienze*

Laureanda: Lucia Bonaldi

ANNO ACCADEMICO 2008/2009

Indice:

Abstract	pag. 4
1) Stato dell'arte	pag. 5
2) Approccio sperimentale	pag. 9
2.1 ó Colture cellulari vegetali	
2.2 ó Proteine di fusione: TAT-DJ-1 e TAT-equorina	
2.3 ó Trattamenti cellulari con le proteine ricombinanti	
2.4 ó Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS	
2.5 ó Western-blot	
2.6 ó Immunoblot	
2.7 ó Determinazione della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare mediante misure al luminometro	
3) Risultati	pag. 12
3.1 ó Internalizzazione della proteina di fusione TAT-DJ-1	
3.2 ó Internalizzazione della proteina di fusione TAT-equorina	
- <i>Messa a punto del protocollo sperimentale</i>	
- <i>Saggi di misurazione di $[\text{Ca}^{2+}]$ in risposta a stimoli fisiologici</i>	
4) Conclusioni	pag. 18
5) Bibliografia	pag. 19

Abstract

Numerosi studi rivolti allo sviluppo di strategie innovative per veicolare macromolecole all'interno delle cellule si sono recentemente focalizzati sulla peculiare capacità del dominio basico YGRKKRRQRRR, compreso tra gli aminoacidi 47 e 57 della proteina TAT del virus dell'HIV-1, di attraversare le membrane cellulari. La maggior parte delle analisi riguardanti i *cell-penetrating peptides* è stata condotta in sistemi animali, mentre ancora limitati sono i dati riguardanti i sistemi vegetali. In questo studio è stata esaminata la capacità di due proteine fuse al peptide TAT di essere traslocate all'interno di cellule vegetali in coltura. Mediante approcci di tipo biochimico (TAT-DJ-1) e saggi di misurazione di Ca^{2+} al luminometro (TAT-equorina), è stato dimostrato che le proteine ricombinanti vengono internalizzate in cellule di soia in coltura in modo efficiente, rapido, concentrazione-dipendente e in forma funzionale. L'analisi comparativa della cinetica delle variazioni della concentrazione di Ca^{2+} (Ca^{2+} signatures), ottenute sottoponendo le cellule a diversi stimoli ambientali, indica una localizzazione prevalentemente citosolica della sonda bioluminescente di Ca^{2+} TAT-equorina. L'internalizzazione cellulare mediante il peptide TAT sembra quindi rappresentare un metodo efficiente e relativamente semplice per introdurre proteine biologicamente attive in cellule vegetali. Le possibili applicazioni di questa tecnica aprono nuove strade nel campo delle biotecnologie vegetali.

1) Stato dell'arte

La traslocazione di molecole idrofiliche, come proteine e acidi nucleici, attraverso le membrane cellulari è impedita dalla bassa permeabilità dovuta alle caratteristiche intrinseche delle membrane biologiche.

Nella ricerca scientifica, la possibilità di trasferire molecole complesse come geni interi all'interno delle cellule rappresenta un campo di rilevante interesse sia per la ricerca di base che applicata. Nel corso del tempo sono stati messi a punto molteplici approcci per il trasferimento genico in cellule animali e vegetali.

Solo per fare una panoramica generale, possiamo citare l'uso di liposomi, nei quali le molecole da trasferire sono adsorbite per affinità e penetrano successivamente alla fusione dei liposomi con la membrana plasmatica; la microiniezione che ha i limiti di esser un processo lungo che permette di transfettare poche cellule e rende difficile il controllo della quantità di molecole iniettate; l'elettroporazione che, come la microiniezione, presenta un alto rischio di danno cellulare, pur consentendo il trasferimento di grandi quantità di molecole; il bombardamento biolistico, che ugualmente comporta il rischio di danni cellulari, oltre ad avere scarsa penetrabilità e richiedere attrezzature costose; l'endocitosi mediata da recettori che riconoscono ligandi naturali fusi con la molecola d'interesse: in questo caso le cellule non vengono danneggiate ma devono necessariamente presentare il recettore specifico. Altre tecniche si servono delle capacità di virus oppure di batteri di funzionare da vettori per il trasferimento genico: la principale tecnica di produzione di piante transgeniche a tutt'oggi è quella mediata da *Agrobacterium tumefaciens* il cui plasmide Ti viene utilizzato quale veicolo per l'ingresso di geni d'interesse. Si potrebbero ancora elencare: la sonicazione, lo shock iposmotico, il congelamento/scongelamento rapido, ecc.

Nonostante siano quindi stati sviluppati numerosi sistemi che consentono di importare macromolecole in cellule viventi, essi presentano una serie di limiti che ne precludono l'uso di routine in studi *in vivo*, in particolare per possibili applicazioni terapeutiche in campo clinico. Gli ostacoli maggiori si possono riassumere nella bassa efficienza di internalizzazione, complessità di manipolazione/ricerca di apparecchi costosi, difficoltà di rilascio nel citosol e talvolta nella tossicità cellulare e nell'immunogenicità.

Recentemente, si è ottenuto il trasferimento diretto di macromolecole in cellule animali grazie ai cosiddetti *cell-penetrating peptides* (CPP), una classe di corti peptidi ricchi in aminoacidi basici, caratterizzati dalla proprietà di traslocare attraverso le membrane cellulari. La loro principale caratteristica pare esser la presenza di arginine, tanto che sono detti anche *arginine-rich intracellular domains* (AID). In letteratura, tali denominazioni si possono riscontrare spesso come sinonime tra loro.

Il CPP più studiato è il dominio della proteina TAT (Transactivating regulatory protein) del virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1) (Fig. 1.1). Tale proteina regolatoria di 86 aminoacidi agisce in natura da transattivatore, in grado di intensificare l'espressione dei geni virali in collaborazione con un fattore cellulare, legando una struttura a stem loop dell'mRNA (TAR) e promuovendo la fase di allungamento della trascrizione. In sua assenza, si generano solo piccoli trascritti e non vengono prodotte tutte le proteine necessarie alla sopravvivenza del virus e all'infezione.

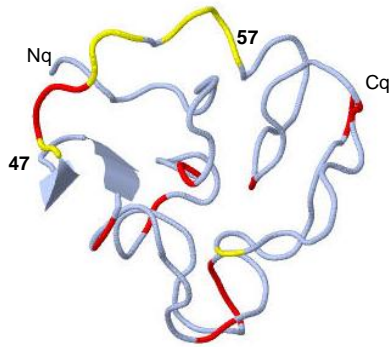


Fig. 1.1 Struttura della proteina TAT. In evidenza, l'AID con i residui basici: in giallo le R, in rosso le K.

Le prime evidenze delle proprietà traslocative della proteina TAT emersero in due articoli pubblicati nel medesimo numero di *Cell* nel 1988 [1,2] che indipendentemente evidenziarono la possibilità per la proteina TAT di entrare in cellule di mammifero quando semplicemente aggiunta al terreno di coltura. La regione della proteina responsabile della traslocazione è un dominio compreso tra gli aminoacidi 47 e 57, ed avente la sequenza **YGRKKRRQRRR**.

In generale, i CPP hanno meno di 20 aminoacidi e carica netta positiva e possiedono la capacità di traslocare attraverso la membrana plasmatica portando con sé eventuali macromolecole di diversa natura, come proteine, acidi nucleici, nanoparticelle. Esistono varie classi, sia derivati da proteine, che sintetici. Alcuni esempi riscontrati in natura sono, oltre al peptide TAT, la penetratina della proteina omeotica di *Antennapedia* (Antp) di *Drosophila*, VP22 del virus della *Herpes simplex* e pVEC, un peptide di 18 aminoacidi derivato dalla caderina dell'endotelio vascolare murino. È interessante notare che tali proteine nel complesso hanno sequenze aminoacidiche e strutture secondarie notevolmente differenti, se non per queste brevi sequenze, mentre il meccanismo di trasferimento all'interno delle cellule appare comune. Provando a modificare tali residui si è compreso che le arginine (R) giocano un ruolo fondamentale. Infatti gli stessi risultati di internalizzazione cellulare sono stati ottenuti con oligopeptidi sintetici costituiti da omoarginine, evidenziando in particolare massima efficienza con R8/9 [3].

La virtù di tali peptidi di penetrare le membrane non è ancora stata spiegata, ed anzi sono riportati dati discordanti in letteratura per quanto concerne il meccanismo d'ingresso. Data la natura idrofobica delle membrane, ci si aspetterebbe che tali domini fortemente basici ed idrofilici non possano entrare. Ad oggi, il meccanismo di tale traslocazione appare poco chiaro e controverso [3]. Alcuni autori suggeriscono che avvenga *free means*, senza l'intervento di recettori né trasportatori attivi e in modo endocitosi-indipendente [4, 5]; altri citano il coinvolgimento della macropinocitosi, o la necessità di molecole sulla superficie di membrana quali i proteoglicani eparan-solfati. Non si esclude l'impiego di più di un meccanismo di internalizzazione, ma bisogna anche tener conto che le proprietà di permeazione possono variare in relazione al tipo di molecola cargo associata, e che i vari CPP possono avere diverse efficienze nei diversi tipi cellulari. Nella maggior parte dei casi, si ritiene che i CPP entrino tramite una via non endocitica e senza richieste energetiche, mostrando un accumulo proporzionale alla concentrazione e non saturabile. Si è ipotizzato che l'ingresso richieda due fasi: l'interazione elettrostatica con gli elementi anionici della superficie cellulare, come le teste fosfolipidiche o le glicoproteine e i glicolipidi, e

la successiva traslocazione attraverso il doppio strato fosfolipidico, probabilmente tramite un meccanismo di *unfolding* e successivo *refolding* da parte di chaperones cellulari.

Sembra inoltre che l'internalizzazione di proteine adotti un meccanismo differente da quello dei plasmidi: quest'ultimo pare inibito a basse temperature (4°C) e risulterebbe così dipendente dall'energia [6]. Nonostante tale processo di traslocazione resti irrisolto, resta indubbia l'efficacia del metodo, che promette di aprire nuove frontiere alla ricerca, in quanto i CPP si offrono quali eccellenti strumenti sia per veicolare sia per far esprimere nelle cellule proteine biologicamente attive.

La maggior parte degli studi di tipo strutturale e funzionale sui CPP è stata condotta in sistemi animali, e sta portando allo sviluppo di nuovi metodi di *gene delivery* e *protein delivery* anche per scopi terapeutici. I sistemi vegetali, al contrario, sono rimasti a lungo inesplorati in questo contesto. Negli ultimi anni si è assistito ad un crescente interesse sull'argomento, come testimoniato da diversi studi riguardanti la traslocazione di CPP in protoplasti o piante *in toto* [4, 5, 7]. Queste analisi potrebbero portare a svariate applicazioni per le ricerche vegetali, eludendo le procedure lunghe e laboriose della transgenesi attuale, non solo nella ricerca di base nelle piante per gli studi di proteine bioattive (ad es. esperimenti di modulazione di funzioni cellulari attraverso l'incorporazione di proteine esogene) ma anche in ambito biotecnologico.

In questo lavoro di tesi ci si è proposti di analizzare la capacità di alcune proteine fuse al peptide TAT di essere traslocate all'interno delle cellule vegetali. In particolare, la maggior parte delle analisi condotte durante il periodo di stage ha riguardato la proteina di fusione TAT-equeorina.

Nel laboratorio in cui si è svolta l'attività sperimentale, da diversi anni è utilizzata la tecnica dell'equeorina ricombinante come metodo estremamente preciso, affidabile e sensibile per monitorare le variazioni della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare in popolazioni cellulari.

L'equeorina è una proteina bioluminescente Ca^{2+} -sensibile derivata dalla medusa *Aequorea victoria*.

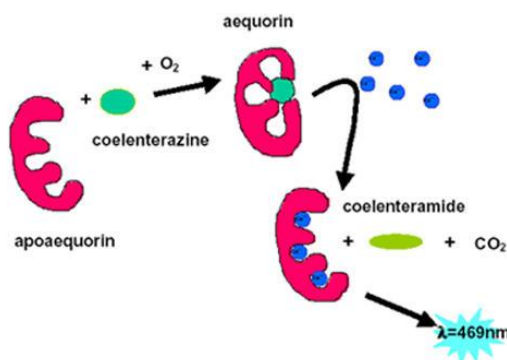


Fig. 1.2 La reazione chemioluminescente dell'equeorina.

Si tratta di un olonucleoproteina costituita da un'apoproteina di 21 kDa in grado di legare covalentemente il gruppo prostetico idrofobico celenterazina, di 423 Da. Ulteriori cofattori sono gli ioni Ca^{2+} per i quali la proteina possiede tre siti di legame. Quando questi ultimi vengono occupati, si genera un cambiamento conformazionale che in presenza di O_2 provoca la perossidazione della celenterazina, originando celenteramide, prodotto instabile che torna rapidamente allo stato basale mediante emissione di luce blu a $\lambda = 469 \text{ nm}$ (Fig. 1.2). La

proteina funzionale è facilmente ricostituita *in vivo* tramite la semplice aggiunta nel medium d'incubazione del gruppo prostetico.

Rispetto agli indicatori fluorescenti del Ca^{2+} , l'equorina può essere espressa nelle cellule trasformate a concentrazioni di 2-3 ordini di grandezza inferiori e misura con accuratezza un ampio range di $[\text{Ca}^{2+}]$ ($0.1 \div 10 \mu\text{M}$), quando invece molti fluorofori tendono ad andare a saturazione. In particolare, è utile nelle misurazioni di alte concentrazioni dello ione, perchè sono disponibili vari metodi per ridurne la sensibilità, ad es. attraverso mutazioni puntiformi nei siti di legame del Ca^{2+} , o tramite l'uso di gruppi prostetici modificati, o con cationi alternativi. Tuttavia, a differenza delle sonde fluorescenti, la singola molecola di equorina può emettere un solo fotone, perciò si ha in generale bassa emissione di luce, che rende necessario operare in popolazioni di almeno 10^3 - 10^4 cellule.

Il vantaggio delle sonde proteiche per il Ca^{2+} è inoltre rappresentato dalla possibilità di misurare le variazioni della concentrazione dello ione in differenti compartimenti cellulari, grazie alla realizzazione di chimere contenenti segnali di *targeting* per il direccionamento specifico della proteina in determinati distretti. Nel nostro lavoro abbiamo dunque analizzato la possibile internalizzazione in cellule vegetali in coltura della proteina equorina mediante il peptide TAT ad essa fuso, come metodo alternativo alle tecniche standard di trasfezione.

2) Approccio sperimentale

2.1 Colture cellulari vegetali.

Il sistema sperimentale utilizzato nel corso degli esperimenti è dato da colture cellulari di soia (*Glycine max* L., Fig. 2.1). Esse vengono mantenute in costante agitazione a 80 rpm in camera termostata alla temperatura di 24°C con un fotoperiodo di 16h di luce e 8h di buio. Il terreno di coltura liquido è KN5⁺ contenente Murashige & Skoog salt mixture 4.3 g/l a pH finale 5.7, saccarosio 5 g/l, e gli ormoni acido -naftalenacetico 1 g/ml e chinetina 0.2 g/ml che mantengono le cellule indifferenziate e ne promuovono la proliferazione.

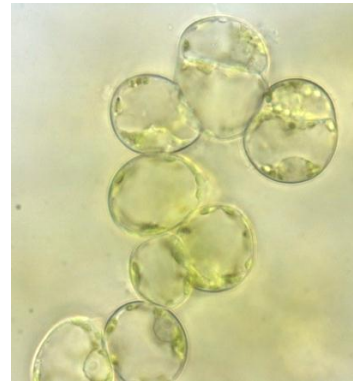


Fig.2.1 Immagine al microscopio ottico di cellule di soia in coltura.

Come controllo positivo, vengono utilizzate colture cellulari di soia trasformate stabilmente con il plasmide pGNAequ/neo2. Tale plasmide contiene il cDNA per la proteina bioluminescente Ca²⁺-sensibile equorina sotto controllo di un promotore costitutivo, e il marker di selezione neomicina fosfotransferasi II. Per tale motivo vengono mantenute in terreno addizionato di kanamicina 10 g/ml, agente selettivo. Le colture di soia sono state gentilmente fornite dal Dr. A. Mithöfer (Jena, Germania).

Sia la linea cellulare wild-type che quella che esprime stabilmente equorina citosolica, vengono rinnovate inoculando 2 ml di sospensione cellulare in 20 ml di terreno fresco ogni 3 settimane, quando le cellule raggiungono la fase di plateau della curva di crescita.

2.2 Proteine di fusione: TAT-DJ-1 e TAT-equorina.

Le proteine di fusione utilizzate in questo lavoro sono state fornite dal prof. A. Negro, del Dipartimento di Chimica Biologica (Università di Padova).

DJ-1 è una proteina oggetto di numerosi recenti studi volti a chiarirne la funzione, in quanto mutazioni nel gene codificante per DJ-1 sono implicate nel morbo di Parkinson. TAT-DJ-1 è una proteina ricombinante contenente la sequenza codificante il dominio di traslocazione della proteina TAT (sottolineato nel testo) MRGSHHHHHGMARGYGRKKRRQRRRPASPGAS, fuso in frame con l'estremità 5' del cDNA codificante per DJ-1 [8].

L'equorina è un indicatore bioluminescente di Ca²⁺, utilizzato come metodo estremamente affidabile e sensibile per misurazioni della concentrazione intracellulare di tale ione in organi interni o colture cellulari. La proteina ricombinante TAT-equorina, data dall'apoproteina fusa all'estremità N-terminale con il peptide TAT, è stata realizzata appositamente per il presente progetto.

Entrambe le proteine di fusione sono state espresse e purificate dal prof. A. Negro, mediante tecniche molecolari standard.

2.3 Trattamenti cellulari con le proteine ricombinanti.

I trattamenti cellulari con la proteina di fusione TAT-DJ-1, così come la preparazione degli estratti citosolici totali e la determinazione della concentrazione proteica dei campioni, sono stati effettuati in laboratorio precedentemente all'inizio del periodo di stage. Per quanto riguarda la proteina di

fusione TAT-equorina, dopo aver sperimentato diversi approcci (vedi sezione Risultati), il protocollo finale ottenuto per i trattamenti delle cellule di soia prevede i seguenti passaggi:

- Trasferire 2 ml di cellule in sospensione in tarda fase esponenziale (circa 3 settimane) in un pozzetto di piastra da microtitolazione.
- Dopo aver fatto sedimentare le cellule sul fondo, prelevare 1.5 ml di mezzo di coltura in modo tale da concentrare le cellule in 500 μ l.
- Al riparo dalla luce, aggiungere 5 μ l di celenterazina 500 M (disciolta in metanolo), in modo tale che sia a concentrazione finale 5 M. Incubare per 2h.
- Effettuare 3 lavaggi con 4 volumi di terreno privo di ormoni KN5⁻ al fine di eliminare l'eventuale celenterazina in eccesso.
- Aggiungere TAT-equorina alla concentrazione desiderata (2, 5, 20, 30 M) e incubare le cellule per 5 min. in agitazione.
- Prelevare tutto il terreno, sostituendolo con 500 μ l di terreno KN5⁻ fresco.
- Effettuare 5 lavaggi da 2 ml ciascuno per eliminare completamente l'eventuale proteina di fusione che non sia penetrata nella cellula.
- Attendere 30 min. prima di procedere con le misurazioni di [Ca²⁺] al luminometro.

Per determinare l'internalizzazione delle proteine di fusione, sono stati eseguiti saggi di tipo biochimico per TAT-DJ-1 e misurazioni di luminescenza per TAT-equorina.

2.4 Elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di SDS.

Gli estratti citosolici proteici sono stati separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodiododecilsolfato (SDS-PAGE).

Questa tecnica si basa sull'attività denaturante dell'SDS che conferisce a tutte le proteine una carica negativa proporzionale alla propria massa proteica, imponendo un unico verso di migrazione quando sottoposte a un campo elettrico uniforme. Il supporto è il gel di poliacrilammide, un copolimero con porosità omogenea e riproducibile.

I campioni vengono preparati diluendoli in soluzione O, tampone di solubilizzazione contenente: glicerolo 10% per rendere il campione più denso e poterlo caricare, mercaptoetanolo 5% riducente che rompe i legami disolfuro tra le Cys, SDS 2.3% detergente anionico che si lega alle proteine, tampone Tris 62.5 mM, pH 6.2, blue di bromofenolo 0.1% come tracciante che indichi il termine della corsa. Per aumentare l'efficienza della denaturazione, i campioni vengono incubati a 95°C per 5 min.

In parallelo vengono caricati dei marker di pesi molecolari (Bio-Rad Precision Plus Protein Standards o dual color). La corsa elettroforetica è condotta a temperatura ambiente, utilizzando come tampone Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%.

2.5 Western-blot.

Dopo separazione su SDS-PAGE, le proteine vengono trasferite mediante Western-blot dal gel ad una membrana di polivinildifluoruro -PVDF- (Millipore), precedentemente attivata immergendola in successione in metanolo per 15 s, H₂O per 2 min., tampone di trasferimento (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanolo

20%), per 5 min. Il trasferimento viene effettuato mediante strumentazione Bio-Rad Semydry Transfer Cell, a 10 V per 30 min.

2.6 Immunoblot.

La procedura di immunoblot prevede i seguenti passaggi:

- Saturazione dei siti aspecifici mediante incubazione della membrana sull'agitatore per 1h ad alta velocità, con una soluzione di latte 5%, Tween20 0.1% in TBS (Tris HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5).
- Legame dell'anticorpo primario (fatto in topo) anti-His-tag diluito 1:3000 in TBS attraverso incubazione in agitazione a massima velocità per 1h.
- Eliminazione dell'anticorpo primario in eccesso con 2 lavaggi da 10 min ciascuno in TBS, Tween20 0.1%.
- Legame dell'anticorpo secondario anti-mouse, coniugato con fosfatasi alcalina (IgG-AP, Boehringer Mannheim) diluito 1:10000 in TBS, latte 1%. La membrana viene incubata sull'agitatore per 1h.
- 2 lavaggi esaustivi come effettuato in precedenza.
- Sviluppo della chemiluminescenza mediante il kit New England BioLabs (incubazione per 5 min in Assay Buffer 0.4 ml, substrate CDP-StarTM 5 μ l, H₂O 9.6 ml).

Si può così procedere con l'autoradiografia, che è fatta in camera oscura per un tempo di esposizione di 5 min. Le soluzioni di sviluppo e di fissaggio sono preparate secondo i kit forniti dalla Sigma: P-5670 Processing Chemicals Kodak D-19 developer e P-6557 Processing Chemicals Kodak Fixer.

2.7 Determinazione della concentrazione intracellulare di Ca²⁺ mediante misure al luminometro.

Per misurare la bioluminescenza emessa dall'indicatore di Ca²⁺ equorina, si utilizza un luminometro (Electron Tubes Limited, Middlesex, UK, Fig. 2.2). Lo strumento è costituito da un fotomoltiplicatore (con amplificatore-discriminatore incorporato) a diretto contatto con una camera da 300 μ l, in cui è posta la sospensione cellulare, ed un contatore di fotoni che raccoglie il segnale rilevato e lo trasmette ad una scheda di acquisizione dati installata in un computer in grado di convertire, mediante un algoritmo, i valori di luminescenza in valori di concentrazione di Ca²⁺ [9]. La procedura standard prevede l'iniezione nella sospensione cellulare di un uguale volume della sostanza da testare (disciolta ad una concentrazione doppia); tale protocollo può essere opportunamente modificato secondo le esigenze. Al termine di ogni esperimento si inietta un uguale volume di soluzione *discharge* data da etanolo 30%, CaCl₂ 1 M, NONIDET P40 4%, per provocare la lisi cellulare e permettere tutto il consumo dell'equorina residua.



Fig.2.2 Luminometro adattato al sistema di misurazione della concentrazione di Ca²⁺ basato sull'equorina in colture cellulari in sospensione.

3) Risultati

In questo lavoro di tesi ci si è proposti di esaminare la capacità del peptide TAT di internalizzare diverse proteine ricombinanti (sistemi vettore-cargo) in cellule vegetali in coltura. A questo scopo colture cellulari di soia sono state incubate, in esperimenti separati, con le proteine di fusione TAT-DJ-1 [8] e TAT-equorina (realizzata appositamente per il presente progetto dal prof. A. Negro, Dipartimento di Chimica Biologica, Università di Padova).

3.1 Internalizzazione della proteina di fusione TAT-DJ-1.

Per esaminare se la proteina di fusione TAT-DJ-1 venisse internalizzata dalle cellule vegetali, è stato utilizzato un approccio di tipo biochimico, analizzando mediante separazione elettroforetica in SDS-PAGE, seguita da Western-blot, estratti citosolici di cellule di soia trattate per intervalli di tempo diversi con TAT-DJ-1 (*Fig. 3.1*). Nella prima corsia sono stati caricati estratti proteici citosolici di cellule di controllo, non trattate: non essendo la proteina endogena, essa risulta completamente assente. Già dopo 5 min di incubazione TAT-DJ-1 risulta esser traslocata nelle cellule (corsia 2). Il successivo abbassamento del livello di proteina dopo 4h (corsia 3) e 24h (corsia 4) potrebbe esser dovuto a sistemi di proteolisi delle cellule vegetali, che forse riconoscono la proteina DJ-1 come estranea.



Fig. 3.1 Immunoblot per esaminare la presenza di TAT-DJ-1. Estratti proteici citosolici totali (50 µg) ottenuti da colture cellulari di soia incubate per intervalli di tempo diversi con la proteina di fusione (3 µM), sono stati separati in SDS-PAGE, trasferiti su PVDF e incubati con anti-His-tag.

3.2 Internalizzazione della proteina di fusione TAT-equorina.

- *Messa a punto del protocollo sperimentale.*

La maggior parte del lavoro svolto si è incentrato sulla proteina di fusione TAT-equorina: nel laboratorio questa sonda è utilizzata da anni come utile strumento per monitorare le variazioni di $[Ca^{2+}]$ intracellulare in popolazioni cellulari e risultava quindi di interesse esaminare la possibilità di ottenere un metodo alternativo alle laboriose tecniche di trasformazione. In questo caso, la valutazione dell'ingresso della proteina di fusione è stata effettuata mediante misurazioni della luminescenza emessa da questa fotoproteina Ca^{2+} -sensibile.

Per prima cosa è stato valutato l'intervallo di tempo minimo necessario per l'incubazione della celenterazina (normalmente in laboratorio il tempo utilizzato era 24h). In questi esperimenti è stata utilizzata la linea cellulare di soia, trasformata con metodo biolistico, che esprime stabilmente equorina nel citosol.

Dai risultati riportati in *Fig 3.2*, si nota come il livello di luminescenza risulti già ottimale per le misure di $[Ca^{2+}]$ dopo sole 2h di incubazione di celenterazina e rimanga pressoché inalterato fino a 24h. Ciò dimostra che l'enzima si

ricostituisce in maniera opportuna già dopo 2h, riducendo i tempi di realizzazione degli esperimenti.

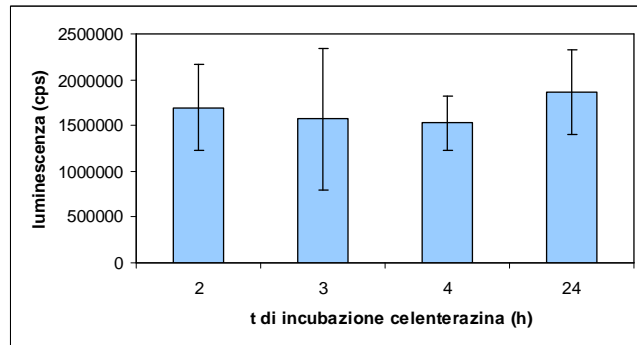


Fig. 3.2 Effetto del tempo di incubazione della celenterazina sull'efficienza di ricostituzione dell'equorina funzionale in cellule di soia che esprimono stabilmente nel citosol la α poproteina. La luminescenza è stata registrata in un intervallo di 200 s in cellule (50 l di sospensione cellulare) lisate somministrando il buffer di discharge. I dati sono la media \pm ds di 3 esperimenti.

In seguito sono stati sperimentati diversi approcci. Incubando le cellule prima con la TAT-equorina e poi con celenterazina e lavando esaurientemente o meno dopo aver fornito la proteina di fusione, non si sono riscontrate differenze significative nei livelli di luminescenza registrati (Fig. 3.3), il che fa supporre che la TAT-equorina entri rapidamente nelle cellule e che la concentrazione del gruppo prostetico sia sufficiente a ricostituire l'enzima, oltre che eventualmente esaurire la TAT-equorina residua rimasta nel terreno di coltura.

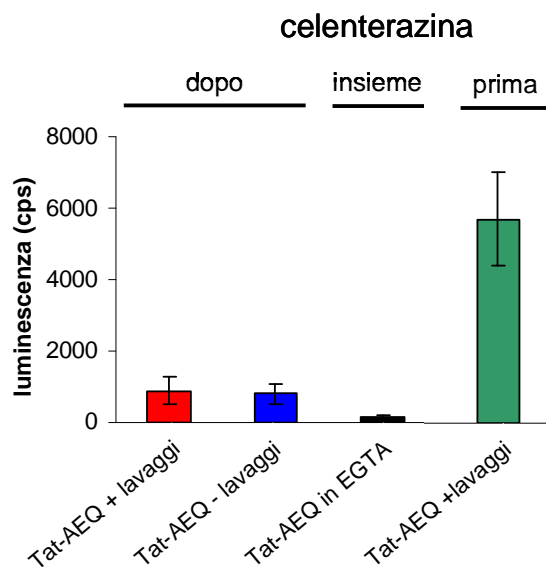


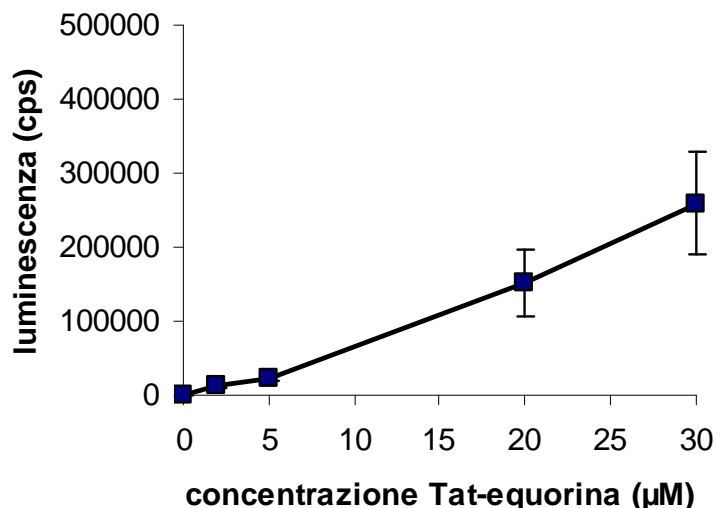
Fig. 3.3 Messa a punto del protocollo sperimentale per il trasferimento di TAT-equorina funzionale in cellule di soia. Le colture sono incubate per 2h con celenterazina (5 μ M) dopo, contemporaneamente o prima dell'incubazione per 1h con TAT-equorina (2 M), in terreno KN5 contenente o meno CaCl_2 . Il trattamento è stato seguito o meno da lavaggi, come indicato in figura. La luminescenza è misurata come descritto in Fig. 3.2. I dati sono la media \pm ds di 3 esperimenti.

Un altro tentativo è consistito nell'incubare contemporaneamente le cellule con TAT-equorina e celenterazina in terreno di coltura Ca^{2+} -free + 600 M EGTA (per chelare eventuali quantità di Ca^{2+} residuo), risospendendo successivamente le cellule in terreno KN5⁻ (contenente 3 mM CaCl_2). Tuttavia, neppure questo protocollo si è rivelato soddisfacente (Fig. 3.3).

Un approccio più promettente è stato quello di incubare le cellule prima con la celenterazina e successivamente con TAT-equorina: con questa procedura il livello di luminescenza è risultato nettamente più elevato (Fig. 3.3).

Un'altra serie di esperimenti è stata volta all'ottenimento di una curva dose-effetto (Fig. 3.4) che ha evidenziato come l'internalizzazione sia dipendente dalla concentrazione della proteina di fusione (e sia apparentemente non saturabile). I livelli di luminescenza ottenuti incubando le cellule con dosi di TAT-equorina pari a 20÷30 μM , sono risultati adeguati per poter effettuare saggi di misurazione della $[\text{Ca}^{2+}]$ al luminometro. Per motivi di tempo, non si è potuta costruire una curva di calibrazione utilizzando equorina purificata (Molecular Probes) per misurare la concentrazione effettiva della proteina di fusione internalizzata dalle cellule.

Fig. 3.4 Curva dose-effetto della proteina di fusione TAT-equorina in cellule di soia in coltura trattate per 5 min. La luminescenza emessa da 100 μl di sospensione cellulare è misurata come descritto in Fig. 3.2. I dati sono la media \pm ds di 3 esperimenti.



La traslocazione della proteina di fusione risulta essere rapida ed efficiente, come evidenziato dal livello di luminescenza che risulta già elevato dopo 5 min di incubazione delle cellule con TAT-equorina (Fig. 3.5).

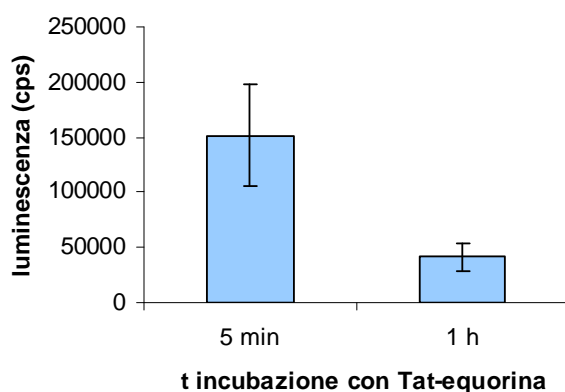


Fig. 3.5 Effetto del tempo di incubazione con la proteina di fusione sull'uptake cellulare. Le colture cellulari di soia sono incubate con TAT-equorina 20 μM per 5 min o 1h. La luminescenza emessa da 100 μl di sospensione cellulare è misurata come già descritto. I dati sono la media \pm ds di 3 esperimenti.

Questo risultato è in accordo con i dati riportati in letteratura riguardo la proteina di fusione TAT-GFP [4] ed anche con i risultati da noi ottenuti con TAT-DJ-1 (Fig. 3.1). La luminescenza cala dopo 1h di incubazione, probabilmente perchè la proteina di fusione viene riconosciuta dai sistemi di proteolisi cellulari come molecola esogena e potenzialmente nociva, con conseguente degradazione. Nella linea di soia che esprime stabilmente equorina, ciò non si verifica perchè la

proteina è continuamente prodotta ad opera di un plasmide sotto controllo di un promotore costitutivo.

Poichè in letteratura è riportato che la bassa temperatura (4°C) non altera il meccanismo di ingresso, anzi in taluni casi parrebbe agevolarlo [5], è stato saggiato l'effetto di un'incubazione a 4°C per valutare la possibile ottimizzazione dei valori di cps totali (fotoni al secondo) misurabili. Il risultato negativo riportato in Fig. 3.6 evidenzia come il fatto di eseguire l'esperimento a basse temperature non sia attuabile nel caso del sistema equorina, in quanto lo stress termico (*cold shock*) viene trasdotto via Ca^{2+} dalle cellule vegetali. Ne consegue che durante l'incubazione a 4°C, una parte della TAT-equorina penetrata nelle cellule emette già fotoni e, pertanto, la luminescenza residua registrabile durante gli esperimenti al luminometro risulta significativamente inferiore.

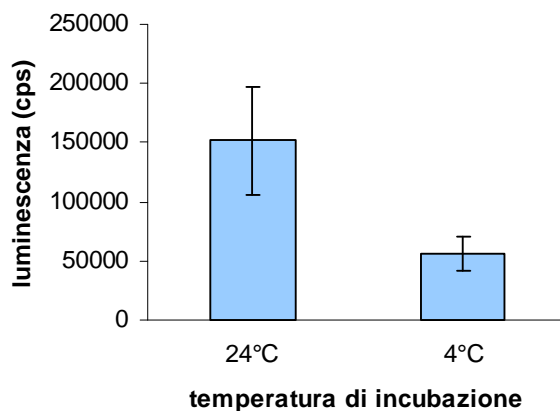


Fig. 3.6 Effetto della temperatura sull'uptake cellulare di TAT-equorina, somministrata a concentrazione 20 μM per 5 min a 24°C o 4°C. La luminescenza emessa da 100 l di sospensione cellulare è stata misurata come già descritto. I dati sono la media \pm ds di 3 esperimenti.

- Saggi di misurazione di $[\text{Ca}^{2+}]$ in risposta a stimoli fisiologici.

Una volta messo a punto il protocollo per internalizzare la TAT-equorina funzionale, è stato possibile iniziare ad effettuare saggi di misurazione della $[\text{Ca}^{2+}]$ nelle cellule di soia.

Le cellule sono state sottoposte a diversi stimoli fisiologici di natura abiotica, per i quali è nota la trasduzione del segnale mediata da Ca^{2+} . Abbiamo analizzato la risposta al *ōtouchō* (iniezione nella sospensione cellulare di un ugual volume del mezzo di coltura), allo shock da freddo (iniezione di 3 volumi di terreno a 4°C), allo stress iperosmotico (mannitolo 600 M) e allo stress salino (NaCl 300 M).

In tutti i casi sono state monitorate delle variazioni transitorie della $[\text{Ca}^{2+}]$, caratterizzate dai parametri cinetici specifici attesi in risposta agli stimoli testati (Fig. 3.7). In particolare, lo stimolo meccanico (*ōtouchō*) determina solo una leggera perturbazione del livello basale di $[\text{Ca}^{2+}]$; lo shock da freddo induce un innalzamento immediato della $[\text{Ca}^{2+}]$ di intensità elevata (circa 4 M dopo 8 s) che si esaurisce molto rapidamente (40 s); le risposte Ca^{2+} a stress di natura osmotica (che mimano le condizioni fisiologiche di siccità e salinità) sono piuttosto simili, codificate in una variazione transitoria della $[\text{Ca}^{2+}]$ che raggiunge un picco di $2\div 2.5$ M dopo una decina di secondi e si esaurisce nel giro di qualche min.

Come confronto, nei riquadri di destra della Fig. 3.7 sono riportate le tracce di Ca^{2+} che si ottengono in cellule di *Arabidopsis* che esprimono stabilmente equorina citosolica, trattate con i medesimi stimoli: si può notare l'ottima corrispondenza delle Ca^{2+} signatures ottenibili con le due differenti metodiche.

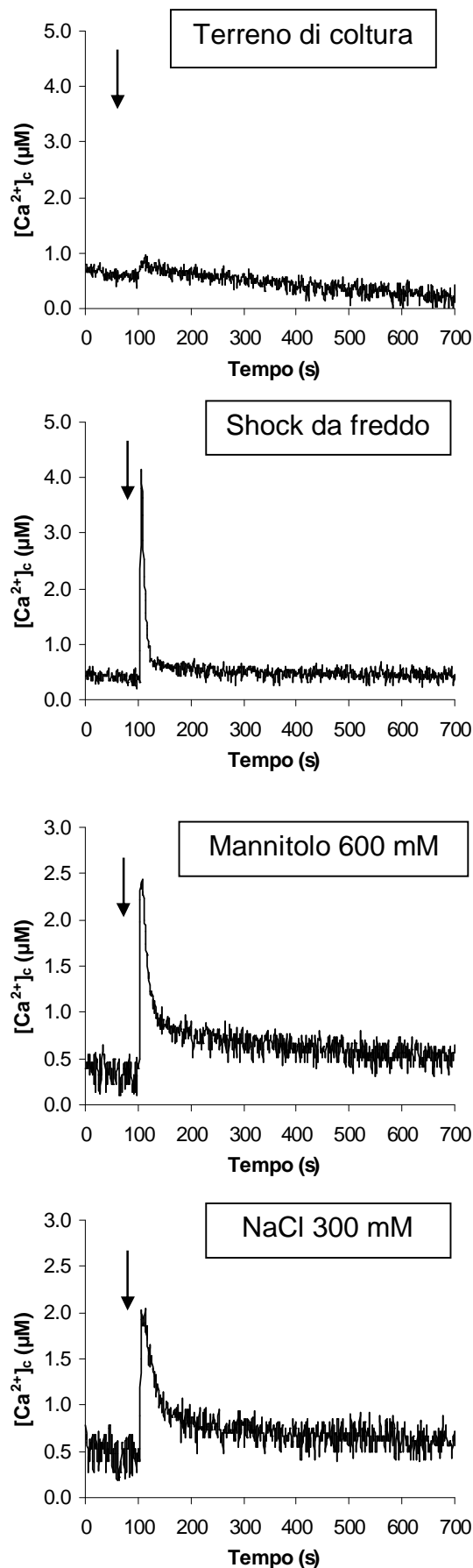
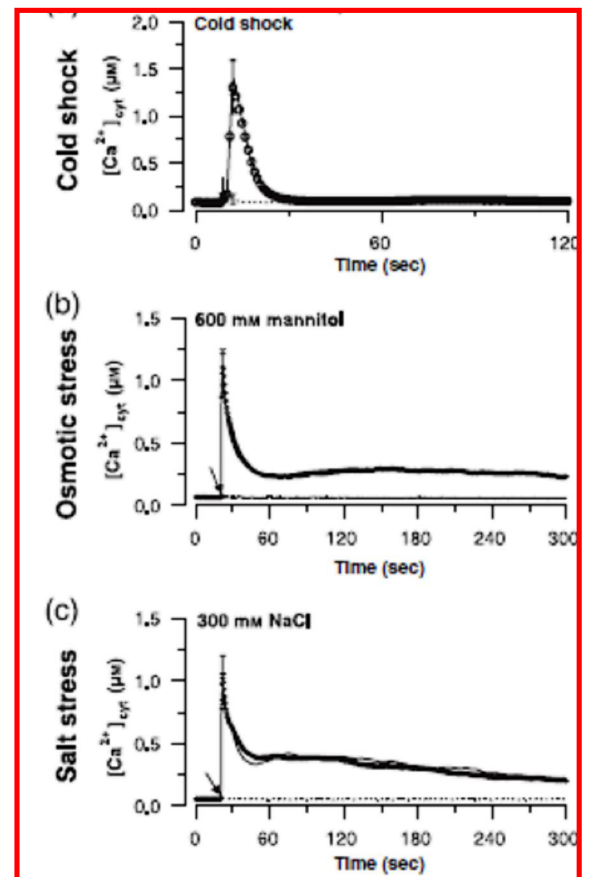


Fig. 3.7 Monitoraggio della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare in colture di soia preventivamente incubate con TAT-euorina 20 M per 5 min e poi sottoposte a diversi stimoli abiotici nell'istante indicato dalla freccia (100 s). Nel riquadro sono riportate le tracce Ca^{2+} registrate in *Arabidopsis* in risposta ai medesimi stimoli [da Ranf et al., 2008, *Plant J.* 53: 287-299].



Successivamente, si è passati ad analizzare la risposta delle cellule ad uno stimolo di natura biotica: gli oligogalatturonidi, frammenti pectici della parete delle cellule vegetali rilasciati in conseguenza all'attacco di patogeni.

La somministrazione di oligogalatturonidi con grado di polimerizzazione 10-15, alla concentrazione 20 $\mu\text{g/ml}$, ha determinato l'induzione di un transiente di Ca^{2+} caratterizzato da una cinetica inaspettata (Fig. 3.8). Nel riquadro è illustrata, come riferimento, la traccia Ca^{2+} che si ottiene nella linea cellulare di soia trasformata con metodo biolistico: l'innalzamento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inizia dopo un periodo di attesa (lag-phase) di 30 s, raggiunge il picco massimo dopo circa 80 s, e si esaurisce entro 10 min.

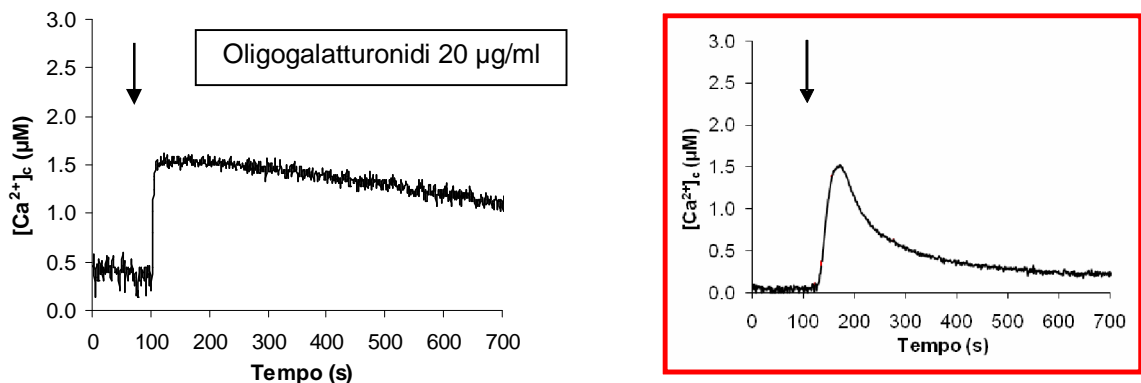


Fig. 3.8 Monitoraggio della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare in colture di soia incubate con TAT-equorina 20 μM per 5 min e poi trattate (freccia) con oligogalatturonidi. Di confronto, nel riquadro è riportata la traccia Ca^{2+} registrata nella linea cellulare di soia che esprime stabilmente equorina citosolica (trasformazione con metodo biolistico) in risposta allo stesso stimolo.

Nelle cellule caricate con TAT-equorina, invece, l'aumento della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ è pressoché immediato, raggiunge il picco massimo (di ampiezza paragonabile) entro 40 s dall'iniezione, e decresce poi molto lentamente nel tempo.

Per cercare di spiegare questo risultato inatteso, dal momento che la traccia di riferimento è ottenuta in cellule che esprimono equorina a localizzazione sicuramente citosolica, la nostra ipotesi è che la proteina di fusione TAT-equorina possa avere collocazione prevalentemente ma non esclusivamente citosolica. Ci sono, infatti, indicazioni in letteratura che la TAT-GFP in parte venga traslocata nel nucleo [4, 10].

La Ca^{2+} signature diversa rispetto all'atteso, sarebbe quindi dovuta al fatto che la trasduzione del segnale oligogalatturonidico coinvolge anche variazioni della $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nel nucleo, e non solo nel citoplasma. Si può pensare in futuro a studi con equorina diretta al nucleo, tali da verificare se le differenze nella cinetica della traccia Ca^{2+} , riscontrate tra le cellule incubate con TAT-equorina e le cellule trasformate con metodo biolistico, siano dovute al fatto che nelle prime le misurazioni sono relative a due compartimenti cellulari contemporaneamente.

La nostra ipotesi è supportata da esperimenti preliminari in cui è risultato che la scarica finale dell'equorina residua, effettuata al termine di ogni esperimento al luminometro per calibrarne il segnale, viene aumentata se al buffer di lisi contenente etanolo viene aggiunto un detergente (NONIDET P40 4%), in grado di lisare le membrane dei compartimenti cellulari (Fig. 3.9).

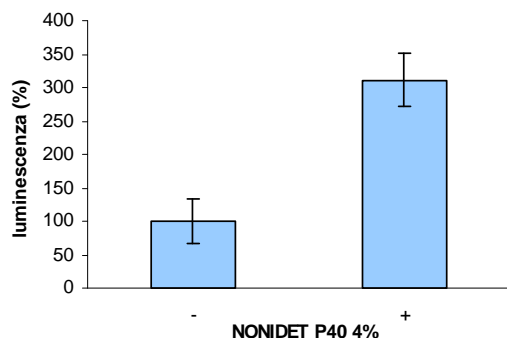


Fig. 3.9 Effetto della presenza o meno di detergente nel tampone di lisi sul livello di luminescenza misurabile in 50 μ l di coltura di cellule di soia precedentemente incubate con TAT-equorina 2 μ M. I dati sono la media \pm ds di 3 esperimenti.

In generale, la presenza di questo tipo di risposte è rassicurante circa il fatto che non vi sia tossicità per le cellule in seguito all'incubazione con la TAT-equorina, sebbene sia opportuno effettuare in futuro un test di vitalità cellulare.

Conclusioni e prospettive future.

Sulla base dei risultati ottenuti, si può dire che l'internalizzazione cellulare di proteine mediante il peptide TAT rappresenta un metodo che sembra poter esser applicato con successo anche nelle cellule vegetali.

Una limitazione può esser data dalla localizzazione non univoca della proteina di fusione all'interno delle cellule; tuttavia, le proprietà di traslocazione del peptide TAT potrebbero esser sfruttate per realizzare tecniche alternative di transfezione, mediante complessazione diretta o indiretta con plasmidi codificanti la proteina di interesse.

Come prospettiva futura, ci si propone di utilizzare dei sistemi nanoparticellari covalentemente legati a TAT. Oltre al CPP canonico (YGRKKRRQRRR), verrà usata anche una variante che presenta 3 residui di glicina finali al posto dei 3 residui di arginina (YGRKKRRQGGG): è stato, infatti, da poco dimostrato che questo peptide TAT mutato è in grado di dirigere il cargo in modo molto più specifico al nucleo [10].

5) Bibliografia

- [1] **M. Green, P. Loewenstein (1988)** Autonomous functional domains of chemically synthesized Human Immunodeficiency Virus Tat trans-activator protein. *Cell* 55: 1179-1188
- [2] **A. D. Frankel, C. O. Pabo (1988)** Cellular uptake of the Tat protein from Human Immunodeficiency Virus. *Cell* 55: 1189-1193
- [3] **S. Futaki (2002)** Arginine-rich peptides: potential for intracellular delivery of macromolecules and the mystery of the translocation mechanisms. *Int. J. Pharmaceutics* 245: 1-7
- [4] **M. Chang, J. Chou, H. Lee (2005)** Cellular internalization of fluorescent proteins via Arginine-rich intracellular delivery peptide in plant cells. *Plant Cell Physiol.* 46: 482-488
- [5] **A. Chugh, F. Eudes (2008)** Cellular uptake of cell-penetrating peptides pVEC and trasportan in plants. *J. Pept. Sci.* 14: 477-481
- [6] **C. Chen, J. Chou, M. Chang, H. Lee (2007)** Transfection and expression of plasmid DNA in plant cells by an arginine-rich intracellular delivery peptide without protoplast preparation. *FEBS Lett.* 581: 1891-1897
- [7] **M. Mäe, H. Myrberg, Y. Jiang (2005)** Internalisation of cell-penetrating peptides into tobacco protoplasts. *Biochem. Biophys. Acta* 1669: 101-107
- [8] **S. Batelli, D. Albani, R. Rameta, L. Polito, F. Prato, M. Pesaresi, A. Negro, G. Forloni (2008)** DJ-1 modulates α -synuclein aggregation state in a cellular model of oxidative stress: relevance for Parkinson's disease and involvement of HSP70. *PLoS ONE* 3(4): e1884
- [9] **M. Brini, P. Pinton, T. Pozzan, R. Rizzuto (1999)** Targeted recombinant aequorins: tool for monitoring $[Ca^{2+}]$ in the various compartments of a living cell. *Microsc. Res. Techniq.* 46: 380-389
- [10] **F. Cardarelli, M. Serresi, R. Bizzarri, F. Beltram (2008)** Tuning the transport properties of HIV-1 Tat arginine-rich motif in living cells. *Traffic* 9: 528-539